



REC'D PCT/PTO 25 JAN 2005
REC'D 24 OCT 2003
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 juillet 2003

Pour le Directeur général de l'Institut national de la propriété Industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE



INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

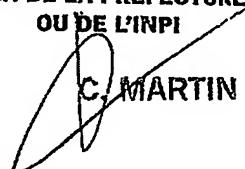
DB 540 IV /260899

REMISE DES PIÈGES JUIL 2002 DATE 75 INPI PARIS LEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		Réserve à l'INPI C209436 25 JUIL. 2002 Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> BR73737/CR/PLC/klip	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	N° Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Particules revêtues en surface de hyaluronane ou d'un de ses dérivés et leur utilisation à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives.			
4 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public à Caractère Scientifique et Technologique	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Adresse	Rue	3 rue Michel Ange	
	Code postal et ville	75794	PARIS CEDEX 16
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISETTE DES PIÈCES	Réserve à l'INPI
DATE	27.01.2002
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0209436
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Vos références pour ce dossier : (facultatif)		BR73737/CR/PLC/khp	DB 540 W /260899
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		NONY & ASSOCIES	
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 Rue de Penthièvre	
	Code postal et ville	75008	PARIS
Nº de téléphone (facultatif)		01.43.12.84.60	
Nº de télécopie (facultatif)		01.43.12.84.70	
Adresse électronique (facultatif)		nony@nony.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>)	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		 Pascale LE COUPANEC 98-0402	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  C. MARTIN	

La présente invention concerne principalement des particules revêtues au moins partiellement en surface de hyaluronane ou dérivé et l'utilisation de ces particules à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives.

La vectorisation est une opération visant à moduler et si possible à totalement maîtriser la distribution d'une substance, en l'associant à un système approprié appelé vecteur.

Dans le domaine de la vectorisation, trois fonctions principales sont à assurer :

- transporter la ou les matières actives dans les liquides biologiques de l'organisme,
- 10 - acheminer les matières actives vers les organes à traiter, et
- assurer la libération de ces matières actives.

A ces trois fonctions, s'ajoute une exigence de biodisponibilité du vecteur. Il doit être biodégradable et ses sous-unités doivent être tolérées par l'organisme.

En fait, le devenir *in vivo* du vecteur est conditionné par sa taille, ses caractéristiques physico-chimiques et, en particulier, ses propriétés de surface qui, d'une part jouent un rôle déterminant avec les composants du milieu biologique et, d'autre part peuvent induire un comportement ciblé vers un site spécifique à traiter.

Les vecteurs biologiques, plus particulièrement concernés dans le cadre de la présente invention, appartiennent au domaine des particules, notamment nano- et micro-particules.

Des nano-particules et micro-particules de poly(acide lactique) (PLA) et/ou de polyester biodégradable dont les produits de dégradation sont des métabolites naturels d'un organisme humain, sont proposées depuis longtemps pour vectoriser des molécules bioactives pour différents types d'administration. Cependant, le caractère hydrophobe de la surface de ces particules ainsi que la présence de groupes carboxylates (extrémités des chaînes de PLA) entraînent une adsorption de protéines plasmatiques, les opsonines, responsables en particulier de la capture des particules par les cellules du Système des Phagocytes Mononucléés (SPM). Il en résulte une disparition rapide des particules du volume circulant en même temps qu'une accumulation dans les organes du SPM (foie, rate, reins).

La présente invention a notamment pour objectif de proposer de nouvelles particules possédant une durée de vie prolongée et particulièrement avantageuses pour

véhiculer des matières actives biologiques ou synthétiques, intéressantes dans le domaine de la rhumatologie.

Dans ce domaine clinique, le praticien est souvent confronté à des pathologies inflammatoires et/ou dégénératives qui engendrent, à plus ou moins long terme, des 5 dégradations parfois irréversibles du cartilage. Outre des traitements non spécifiques à base d'antalgiques et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, on peut avoir recours, entre autres, à des injections locales de corticoïdes. Les doses élevées de corticoïdes utilisées dans ce cas de figure peuvent, toutefois, induire des effets indésirables non négligeables. Par ailleurs, il est généralement nécessaire de multiplier ces injections en raison d'une action 10 bénéfique trop réduite.

L'administration de ce type de matières actives par l'intermédiaire de particules serait donc une alternative particulièrement avantageuse aux thérapies conventionnelles.

En l'occurrence, la présente invention vise notamment à proposer un vecteur de 15 type particules qui, d'une part est biodégradable et approprié au relargage contrôlé d'une matière active et, d'autre part est capable de cibler efficacement la libération de cette matière active au niveau des cellules tissulaires et plus particulièrement des cellules possédant des récepteurs spécifiques aux hyaluronanes, encore dénommés CD44.

Ces récepteurs sont notamment présents au niveau des cellules de la sphère 20 articulaire comme par exemple les chondrocytes et les synoviocytes. Les chondrocytes sont des cellules impliquées dans la synthèse de la matrice cartilagineuse. Elles gèrent également le maintien de l'homéostasie du cartilage. Les synoviocytes qui sont des cellules localisées dans la membrane synoviale, sont pour leur part impliquées dans la synthèse du hyaluronane dans le liquide synoviale.

25 De manière inattendue, les inventeurs ont mis en évidence qu'il était possible de cibler efficacement le relargage d'une matière active encapsulée dans des particules vers des cellules possédant notamment ce type de récepteur, en les fonctionnalisant en surface avec du hyaluronane.

Un premier aspect de l'invention concerne donc des particules dont le cœur est 30 à base d'au moins un polymère organosoluble biodégradable, caractérisées en ce qu'elles sont revêtues, au moins partiellement en surface, de hyaluronane ou de l'un de ses dérivés.

L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel constitué par une

succession de motifs disaccharidiques N-acétylglucosamine/acide glucuronique et dont les solutions aqueuses ont une viscosité élevée. Il est présent notamment dans le cordon ombilical, dans l'humeur vitrée et dans le liquide synovial. Il est également produit par certaines bactéries, notamment par des streptocoques hémolytiques des groupes A et C. La 5 masse molaire de l'acide hyaluronique peut varier de 10 000 à 10 000 000 g environ, selon l'origine. L'acide hyaluronique est commercialisé notamment sous la forme de son sel de sodium (encore dénommé hyaluronate). On utilise le terme générique « hyaluronane » pour désigner indistinctement l'acide hyaluronique et les hyaluronates, notamment sous la forme de sels inorganiques ou organiques et en particulier les sels alcalins et/ou alcalino-10 terreux.

Plus particulièrement, ce hyaluronane peut être mis en œuvre sous la forme de l'un de ses dérivés, en particulier un hyaluronane amphiphile et hydrosoluble. Il peut notamment s'agir d'un hyaluronane dont les fonctions carboxyliques sont en partie transformées de manière à figurer des groupements hydrophobes. Cette transformation est, 15 effectuée à un taux suffisant pour conférer un comportement amphiphile audit hyaluronane.

La transformation des fonctions carboxyliques du hyaluronane peut par exemple être obtenue par une estérification et/ou amidification partielle de ces fonctions. De tels dérivés sont notamment décrits dans FR 2 794 793.

20 Les groupes hydrophobes peuvent notamment dériver de l'estérification des fonctions carboxyliques par au moins un groupe choisi parmi :

– des chaînes alkyles, linéaires ou ramifiées, saturées ou insaturées, pouvant être interrompues par un ou plusieurs hétéroatomes comme les atomes de S, O et N, et le cas échéant, substituées par au moins un noyau aromatique, et

25 – des oligomères comme ceux dérivant des α -hydroxyacides.

Les chaînes alkyles peuvent posséder un nombre d'atomes de carbone supérieur à 5 et notamment supérieur à 10. Toutefois, dans le cas particulier où une telle chaîne est substituée par un noyau aromatique, son nombre d'atomes de carbone peut être réduit.

30 Le taux de transformation est généralement ajusté de manière à préserver une hydrosolubilité suffisante au dérivé hyaluronane amphiphile ainsi obtenu.

Il est également contrôlé en tenant compte de l'hydrophobie des groupes fixés

sur le hyaluronane.

D'une manière générale, concernant les chaînes alkyles, plus la chaîne est longue, plus le taux de fixation au niveau du squelette hyaluronane pourra être faible. Inversement, avec des chaînes alkyles courtes, le taux de fixation pourra être plus élevé. Il 5 est clair que cet ajustement entre le taux de fixation et la longueur des chaînes alkyles relève des compétences de l'homme de l'art.

A titre indicatif, pour une chaîne alkyle contenant environ 18 atomes de carbone, le taux d'estérification peut être d'au plus 10 %, voire inférieur à 7 % et, notamment inférieur à 6 % et en particulier compris entre 0,05 et 5 %. Pour une chaîne 10 alkyle à 12 carbones, ce taux d'estérification peut être supérieur ou égal à 25 % et pour une chaîne alkyle de 6 carbones, il peut être de l'ordre de 50 %.

Le taux de transformation est également ajusté de manière à ne pas affecter l'affinité naturelle du hyaluronane pour les récepteurs CD44.

La présence de hyaluronane en surface de particules est particulièrement 15 avantageuse pour les diriger sélectivement vers les récepteurs CD44 présents notamment sur les cellules de la sphère articulaire. Grâce à cette enveloppe hyaluronane, les particules, selon l'invention, utilisées à titre de vecteur biologique pour une matière active biologique ou synthétique permettent avantageusement de cibler efficacement la libération de cette matière active au niveau des cellules à récepteurs CD44, par exemple des chondrocytes 20 et/ou des synoviocytes. Il en résulte une action contrôlée et prolongée de cette matière active au niveau de la lésion visée. Ce dernier aspect est particulièrement intéressant pour le bien-être du patient, dans la mesure où il donne accès à une meilleure disponibilité du médicament et donc, permet de réduire les quantités administrées et leur fréquence d'administration.

25 La biodégradabilité des particules revendiquées est, par ailleurs, également assurée grâce à la nature des polymères qui les constituent.

Au sens de l'invention, on entend désigner sous l'appellation « biodégradable » tout polymère qui se dissout ou se dégrade en une période acceptable pour l'application à laquelle il est destiné, habituellement en thérapie *in vivo*. Généralement, cette période doit 30 être inférieure à 5 ans et plus préférentiellement à une année lorsque l'on expose une solution physiologique correspondante à un pH de 6 à 8 et à une température comprise entre 25 °C et 37 °C.

Les polymères biodégradables selon l'invention sont ou dérivent de polymères biodégradables synthétiques ou naturels.

Concernant les polymères biodégradables organosolubles utilisables pour constituer le cœur des particules, ils peuvent notamment être choisis parmi les polyesters comme les poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL), les polyanhydrides, poly(alkylcyanoacrylates), polyorthoesters, poly(alkylène tartrate), polyphosphazènes, polyaminoacides, polyamidoamines, polycarbonates, polyméthylidènemalonate, polysiloxane, le polyhydroxybutyrate ou le poly(acide malique), ainsi que leurs copolymères et dérivés.

Selon une variante particulière de l'invention, les particules revendiquées possèdent une matrice polymérique incorporant au moins un polymère différent du hyaluronane. Plus préférentiellement, elle sont constituées d'un polymère autre que le hyaluronane.

Sont notamment préférés comme polymères organosolubles biodégradables selon l'invention, les polyesters comme les poly(acide lactique), poly(acide glycolique), poly(ϵ -caprolactone), et leurs copolymères, comme par exemple le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA).

Selon une variante particulière de l'invention, les particules sont composées majoritairement, voire en totalité, de poly(acide lactique).

Les particules selon l'invention, comprennent de préférence au moins une matière active biologique ou synthétique de type médicament sous une forme encapsulée dans le cœur de polymère.

Comme matières actives biologiques, on peut plus particulièrement citer les peptides, les protéines, les carbohydrates, les acides nucléiques, les lipides, les polysaccharides ou leurs mélanges. Il peut également s'agir de molécules organiques ou inorganiques synthétiques, qui, administrées *in vivo* à un animal ou à un patient, sont susceptibles d'induire un effet biologique et/ou manifester une activité thérapeutique. Il peut ainsi s'agir d'antigènes, d'enzymes, d'hormones, de récepteurs, de vitamines et/ou de minéraux.

A titre représentatif et non limitatif des médicaments susceptibles d'être incorporés dans ces particules, on peut citer les composés anti-inflammatoires, les anesthésiants, les agents chimiothérapeutiques, les immunotoxines, les agents

immunosuppresseurs, les stéroïdes, les antibiotiques, les antiviraux, les antifongiques, les antiparasitaires, les substances vaccinantes, les immunomodulateurs et les analgésiques.

Dans la mesure où les particules selon l'invention sont avantageusement ciblées vers les cellules de structure tissulaires comme par exemple les chondrocytes et
5 synoviocytes, on peut privilégier l'utilisation à titre de matières actives des composés suivants : les anti-inflammatoires, des composants matriciels comme par exemple les glycosaminoglycane et des facteurs biologiques impliqués dans le processus de régénération et/ou protection du cartilage. Les particules ont notamment pour avantage de protéger efficacement ce type de matière active particulièrement sensibles au phénomène
10 de biodégradation.

Les particules conformes à l'invention peuvent comprendre jusqu'à 95 % en poids d'une matière active.

La matière active peut ainsi être présente en une quantité variant de 0,001 à 950 mg/g de particule et préférentiellement de 0,1 à 500 mg/g. Il est à noter que dans le cas
15 de l'encapsulation de certains composés macromoléculaires (ADN, oligonucléotides, protéines, peptides, etc) des charges encore plus faibles peuvent être suffisantes.

Les particules selon l'invention peuvent posséder une taille comprise entre environ 50 nm et environ 600 µm et notamment entre environ 80 nm et environ 250 µm.

Les particules selon l'invention possédant une taille comprise entre 1 et
20 1000 nm sont dénommées nanoparticules. Les particules dont la taille varie de 1 à plusieurs milliers de microns font référence à des microparticules.

Les particules sont généralement sous forme sphérique, mais peuvent également se présenter sous d'autres formes.

Les nanoparticules ou microparticules revendiquées peuvent être préparées
25 selon des méthodes déjà décrites dans la littérature, et plus particulièrement peuvent être obtenues par la technique d'émulsion/évaporation du solvant et notamment celle décrite par R. Gurny *et al.* « *Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs* » Drug Dev. Ind. Pharm., vol. 7, p. 1-25 1981.

De manière inattendue, les inventeurs ont ainsi mis en évidence que les
30 hyaluronanes amphiphiles précités pouvaient avantageusement être utilisés à la place des tensioactifs conventionnels pour la préparation de particules selon la technique émulsion/évaporation de solvant.

En fait, deux variantes de cette technique sont considérées selon la nature hydrophobe ou hydrophile de la matière active à encapsuler.

Lorsque que l'on cherche à encapsuler une matière active hydrophobe, on prépare une simple émulsion. Pour ce faire, le polymère biodégradable choisi est dissous dans la phase organique, notamment un solvant peu soluble dans l'eau comme par exemple du chlorure de méthylène ou de l'acétate d'éthyle, avec la matière active à encapsuler. Le hyaluronane amphiphile, est pour sa part dissous dans la phase aqueuse qui sert de milieu dispersant à la phase organique. A l'issue du mélange de ces deux phases, le dérivé hyaluronane se localise à l'interface eau/phase organique grâce à ses propriétés amphiphiles et stabilise ainsi l'émulsion. Lors de l'évaporation du solvant organique, les dérivés amphiphiles de hyaluronane demeurent avantageusement fixés à la surface des particules ainsi formées, les groupes hydrophobes étant ancrés plus ou moins profondément dans le cœur de polymère organosolubles formant les particules et la partie hydrophile, correspondant principalement au squelette hyaluronane, étant exposée à la surface. A la fin de l'évaporation du solvant, on récupère des particules conformes à l'invention qui subissent ensuite un lavage à l'eau, une centrifugation ou une lyophilisation.

Dans le cas où la matière active à encapsuler est hydrophile à l'image des protéines et polysaccharides par exemple, on prépare une première émulsion de type huile dans eau, composée d'une phase organique contenant le polymère organosoluble biodégradable et d'une première phase aqueuse contenant la matière active. Cette émulsion dite inversée est ensuite mise en présence d'une seconde phase aqueuse contenant le dérivé hyaluronane amphiphile de manière à obtenir une double émulsion eau/huile/eau vis-à-vis de laquelle le hyaluronane amphiphile joue le rôle de stabilisant. Après évaporation du solvant, on récupère des particules conformes à la présente invention qui sont traitées comme précédemment.

Les conditions utilisées lors de la préparation des émulsions déterminent généralement la taille des particules et leur ajustement relève des compétences de l'homme de l'art.

L'utilisation d'un dérivé hyaluronane à titre d'agent stabilisant dans ce type de procédé de préparation de particules est donc particulièrement avantageuse à au moins deux titres :

- elle permet de s'affranchir de la présence des agents tensioactifs systématiquement utilisés dans les procédés conventionnels. En l'occurrence, ces derniers ne sont pas toujours biocompatibles et parfois difficiles à éliminer en fin de synthèse ;
- elle conduit à l'issue de la synthèse des particules, à un vecteur manifestant une affinité sélective pour des cellules de structure tissulaire et plus particulièrement pour des cellules de la sphère articulaire et en particulier pour les chondrocytes et les synoviocytes.

La concentration de hyaluronane dans le milieu de synthèse des particules, détermine le taux de recouvrement des particules, c'est-à-dire la quantité de hyaluronane déposée à leur surface. Le dérivé hyaluronane est généralement réparti de manière homogène en surface des particules avec une densité surfacique pouvant varier de manière significative.

On peut également incorporer dans les particules, des composés à finalité de diagnostic. Il peut ainsi s'agir de substances détectables par rayons X, fluorescence, ultrasons, résonance magnétique nucléaire ou radioactivité. Les particules peuvent ainsi inclure des particules magnétiques, des matériaux radio-opaques, comme notamment le baryum ou des composés fluorescents. Alternativement, des émetteurs gamma (par exemple Indium ou Technetium) peuvent y être incorporés.

Comme décrit précédemment, la matière active est de préférence incorporée dans ces particules lors de leur processus de formation. Toutefois, lorsque cela s'avère possible, elle peut également être chargée au niveau des particules une fois que celles-ci sont obtenues.

Les particules selon l'invention peuvent être administrées de différentes façons, par exemple par voie orale ou parentérale et notamment par voies intra-articulaire, oculaire, pulmonaire, nasale, vaginale, cutanée et/ou buccale.

Les hyaluronanes présents en surface des particules selon l'invention, portant une multitude de fonctions OH réactives, il est en outre possible une fois les particules formées, de fixer à ses fonctions toutes sortes de molécules par des liaisons covalentes. A titre illustratif et non limitatif de ce type de molécules, on peut notamment citer les molécules de type marqueurs et les composés susceptibles de potentialiser la fonction de ciblage assurée par le hyaluronane, comme par exemple des peptides RGD (arginine glycine - acide aspartique) qui favorisent l'adhésion entre les cellules et leurs matrices

extracellulaires.

Un second aspect de l'invention concerne un vecteur biologique notamment pour une ou plusieurs matière(s) active(s) biologique(s) ou synthétique(s) comprenant au moins des particules selon l'invention.

5 L'invention concerne également l'utilisation de ce vecteur, ou des particules revendiquées pour encapsuler au moins une matière active, biologique ou synthétique.

10 Un autre aspect de l'invention se rapporte à des compositions pharmaceutiques ou de diagnostic comprenant au moins un vecteur et notamment des particules selon l'invention, le cas échéant associé(es) à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible.

Comme évoqué précédemment, les particules revendiquées sont particulièrement avantageuses sur le plan pharmaceutique ou du diagnostic.

15 Elles assurent une protection satisfaisante de la matière active encapsulée. Elles limitent la diffusion de cette matière active dans l'organisme grâce à l'effet stérique des particules en soi et à l'affinité naturelle du hyaluronane pour les récepteurs CD44. Elles autorisent une libération progressive de cette substance active à proximité de la lésion et/ou des cellules visées permettant ainsi une action prolongée. Enfin, elles se dégradent lentement en produits bien tolérés par l'organisme.

20 Les particules peuvent également être incorporées dans des capsules, ou incorporées dans des implants, gels ou tablettes. Elles peuvent également être formulées directement dans un fluide de type huile par exemple et être injectées directement au niveau du site biologique à traiter.

25 Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de hyaluronane ou dérivé notamment de hyaluronane amphiphile tel que défini précédemment à titre d'agent de ciblage en surface de particules, en particulier constituées d'au moins un polymère biodégradable ou de capsules, notamment creuses. Ces particules ou capsules peuvent notamment être des nano- ou micro-sphères ou des nano- ou micro-particules.

30 Les exemples et figures présentés ci-après sont soumis à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

FIGURES :

Figure 1 : Représentation de la prolifération cellulaire de chondrocytes de rats cultivés en système monocouche après 48 h de traitement en présence de nanoparticules à

base de PLA (témoin) et de PLA revêtue de hyaluronane amphiphile.

Figure 2 : Représentation de la prolifération cellulaire et activité de synthèse en protéoglycanes, de chondrocytes cultivés sur billes d'alginate (culture tridimensionnelle) après 48 heures de traitement en présence de nanoparticules à base de PLA (témoin) et de
5 PLA revêtue de hyaluronane amphiphile.

MATERIEL ET METHODE

Synthèse des HA modifiés

10 A titre d'exemple, est décrite ci-dessous la synthèse d'un hyaluronane substitué par des chaînes aliphatiques à 18 carbones.

Le hyaluronate de sodium (HA, $\overline{M_w} = 600\,000$ g/mol) provient de la Société Bioibérica (Barcelone, Espagne).

15 1 g de hyaluronate de sodium est dissous dans 100 ml d'eau distillée. La solution est mise en contact pendant 15 minutes avec 5 g de résine Dowex 50*8 échangeuse de cations conditionnée en H^+ à 2,5 meq/g (stoechiométrie 1:6). Après filtration, la solution contenant la forme acide du polysaccharide est neutralisée à pH 7 à l'hydroxyde de tétrabutylammonium, puis lyophilisée. On obtient ainsi le hyaluronate de tétrabutylammonium HA-TBA.

20 1 g de HA-TBA est dissous dans 100 ml de diméthylsulfoxyde. 36 μ l de $C_{18}H_{37}Br$ sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 30 °C sous agitation, le mélange est mis en dialyse : 1 jour contre eau distillée, 6 jours contre eau distillée + azide NaN_3 (1/2500) puis 1 jour contre eau distillée. Enfin, la solution dialysée est lyophilisée.

25 On obtient ainsi un dérivé du hyaluronate de sodium dont environ 4 % des fonctions carboxyliques sont estérifiées par des chaînes à 18 carbones.

EXEMPLE 1 :

Synthèse et caractérisation de particules conformes à l'invention.

30 A titre d'exemple, est donné ci-dessous le protocole de synthèse de particules recouvertes du hyaluronate amphiphile HA-C₁₈-1,3 % c'est-à-dire d'un polymère contenant 1,3 chaînes alkyle à 18 carbones pour 100 motifs glucose.

Le poly(D,L-acide lactique) (PLA, $\overline{M_w} = 106\ 000\text{g/mol}$) et le dichlorométhane (CH_2Cl_2) sont des produits Sigma-Aldrich (France).

10 mg de HA-C₁₈-1,3 % sont dissous pendant 24 h sous agitation dans 10 ml d'eau distillée. On ajoute 1 ml de CH_2Cl_2 contenant 25 mg de PLA. Une émulsion huile 5 dans eau stable est réalisée par l'utilisation d'un vortex pendant 30 s puis des ultra-sons à une puissance de 10 W en mode pulsé (50 % de cycle actif) pendant 60 s. Le solvant organique est ensuite évaporé sous agitation, à température et pression ambiantes pendant 2 h. La suspension aqueuse de particules ainsi obtenue est lavée à l'eau par 3 centrifugations successives de 10 mn à 12 000 tr/mn.

10 Les particules obtenues dans ces conditions ont un diamètre moyen de 450 nm (diamètre moyen en intensité, déterminé par spectroscopie à corrélation de photons sur un appareil Malvern 4600).

EXEMPLE 2 :

15 Evaluation biologique *in vitro* des particules conformes à l'invention.

Des chondrocytes (cellules du cartilage) de rats obtenus après digestion de fragments de cartilage par la pronase et par la collagénase, sont mis en culture dans du DMEM (Gibco BRL, RU) en présence de particules obtenues selon l'exemple 1.

20 Deux systèmes de culture sont utilisés :

1) un système en monocouche classique applicable à tous les types cellulaires et qui permet d'appréhender les paramètres généraux de biocompatibilité tels que la viabilité et la prolifération.

25 Les chondrocytes sont répartis dans des plaques de culture à 24 trous à raison d'environ 100 000 chondrocytes par trou. Une suspension de nanoparticules recouvertes de HA amphiphile et synthétisées selon l'exemple 1, est préparée dans le milieu de culture DMEM de façon à avoir en moyenne environ 10^7 particules par ml. 1 ml de cette suspension est mis en contact avec les chondrocytes dans les trous de culture ce qui donne un ratio moyen d'environ 100 particules par chondrocyte. Le contact est maintenu 30 pendant 48 h.

La figure 1 montre qu'après ce contact de 48 h avec des particules recouvertes de HA amphiphiles substitués à différents taux par des chaînes à 18 ou 12 atomes de

carbone, la viabilité et la prolifération des chondrocytes sont similaires à celles obtenues avec le témoin.

En revanche, on peut observer que dans ces conditions expérimentales, la présence des particules de PLA nues modifie significativement ces paramètres.

5 2) un système tridimensionnel : dans le cas des chondrocytes, on complète l'analyse précédente par l'étude d'une culture dans des billes d'alginate de calcium qui sont enrichies ou non en particules conformes à l'invention, afin d'appréhender l'activité de synthèse des protéoglycans du chondrocyte dans cet environnement nano ou microparticulaire.

10 Les culots cellulaires sont suspendus dans une solution d'alginate de sodium à 2 % dans du NaCl stérile 0,9 % et contenant les particules recouvertes de HA, de façon à avoir approximativement 500 000 chondrocytes par ml et en moyenne environ 200 nanoparticules par chondrocyte. La suspension résultante est alors déposée au goutte à goutte dans une solution de CaCl₂ 100 mM à l'aide d'une seringue de 2 ml équipée d'une 15 aiguille 0,8x25, ce qui permet de former des billes d'environ 2 mm de diamètre au contact du CaCl₂. Après repos de 20 mn dans la solution de CaCl₂, les billes sont lavées 2 fois de suite par du NaCl 0,9 %.

20 La figure 2 montre que le contact avec des nanosphères recouvertes de HA amphiphiles substitués à différents taux par des chaînes à 18 ou 12 atomes de carbone, ne perturbe pas significativement la prolifération et l'activité métabolique des chondrocytes dans cet environnement.

REVENDICATIONS

1. Particules dont le cœur est à base d'au moins un polymère organosoluble
5 biodégradable, caractérisées en ce qu'elles sont revêtues, au moins partiellement en surface, de hyaluronane ou de l'un de ses dérivés.

2. Particules caractérisées en ce que le hyaluronane est un hyaluronane amphiphile et hydrosoluble.

3. Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que le
10 hyaluronane est un hyaluronane dont les fonctions carboxyliques sont en partie transformées pour figurer des groupes hydrophobes.

4. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que le hyaluronane est un hyaluronane dont les fonctions carboxyliques sont en partie estérifiés à l'aide d'au moins un groupe choisi parmi des chaînes alkyles, linéaires ou
15 ramifiées, saturées ou insaturées pouvant être interrompues par un ou plusieurs hétéroatomes et le cas échéant substituées par un noyau aromatique et des oligomères dérivant d' α -hydroxyacides.

5. Particules selon la revendication 4, caractérisées en ce que le hyaluronane est estérifié à raison d'au plus 10 % de ses fonctions carboxyliques par une chaîne alkyle
20 possédant environ 18 atomes de carbone.

6. Particules selon la revendication 5, caractérisées en ce que le taux d'estérification est inférieur à 6 %.

7. Particules selon la revendication 4, caractérisées en ce que le hyaluronane est estérifié à raison d'au moins 25 % de ses fonctions carboxyliques par une chaîne alkyle
25 possédant environ 12 atomes de carbone.

8. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le polymère organosoluble biodégradable est ou dérive d'un polymère biodégradable synthétique ou naturel.

9. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes,
30 caractérisées en ce que le polymère organosoluble biodégradable est un polymère choisi parmi les polyesters de type poly(acide lactique), poly(acide glycolique), poly(ϵ -caprolactone), les polyanhydrides, poly(alkylcyanoacrylates), polyorthoesters,

poly(alkylène tartrate), polyphosphazènes, polyaminoacides, polyamidoamines, polycarbonate, polyméthylidènemalonate, polysiloxane, polyhydroxybutyrate, poly(acide malique), leurs copolymères ou dérivés.

10. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisées en 5 ce que le polymère organosoluble biodégradable est choisi parmi le poly(acide lactique), poly(acide glycolique), poly(caprolactone) et leurs copolymères.

11. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre au moins une matière active biologique ou synthétique encapsulée dans le cœur de polymère.

10 12. Particules selon la revendication 11, caractérisées en ce que la matière active encapsulée est au moins une matière biologique choisie parmi les peptides, protéines, carbohydrates, acides nucléiques, lipides, polysaccharides, antigènes, enzymes, hormones, récepteurs, vitamines, les composants matriciels comme par exemple les glycosaminoglycans, les facteurs biologiques impliqués dans le processus de régénération 15 et/ou protection du cartilage et leurs mélanges.

20 13. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que la matière active est une au moins matière active synthétique notamment de type médicamenteux choisie parmi les composés anti-inflammatoires, anesthésiants, agents chimiothérapeutiques, immunotoxines, agents immunosuppresseurs, stéroïdes, antibiotiques, antiviraux, 25 antifongiques, antiparasitaires, substances vaccinantes, immunomodulateurs et analgésiques.

14. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent jusqu'à 95 % en poids d'une matière active.

25 15. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles possèdent une taille comprise entre 50 nm et 600 µm et de préférence entre 80 nm et 250 µm.

16. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'il s'agit de nanoparticules.

30 17. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisées en ce qu'il s'agit de microparticules.

18. Particules selon l'une quelconque des revendications 2 à 17, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par la technique d'émulsion/évaporation du solvant en

utilisant à titre d'agent stabilisant d'émulsion au moins ledit hyaluronane amphiphile.

19. Vecteur biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

20. Utilisation de particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 18,
5 ou d'un vecteur selon la revendication 19 pour encapsuler au moins une matière active.

21. Composition pharmaceutique ou de diagnostic comprenant au moins des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 ou un vecteur selon la revendication 19, associé(es) le cas échéant à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible.

10 22. Utilisation de hyaluronane ou dérivé à titre d'agent de ciblage en surface de particules ou de capsules.

23. Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que le hyaluronane est un hyaluronane amphiphile tel que défini en revendications 2 à 7.

15 24. Utilisation selon la revendication 22 ou 23, caractérisée en ce que les particules ou capsules sont des nano- ou micro-sphères ou des nano- ou micro-particules.

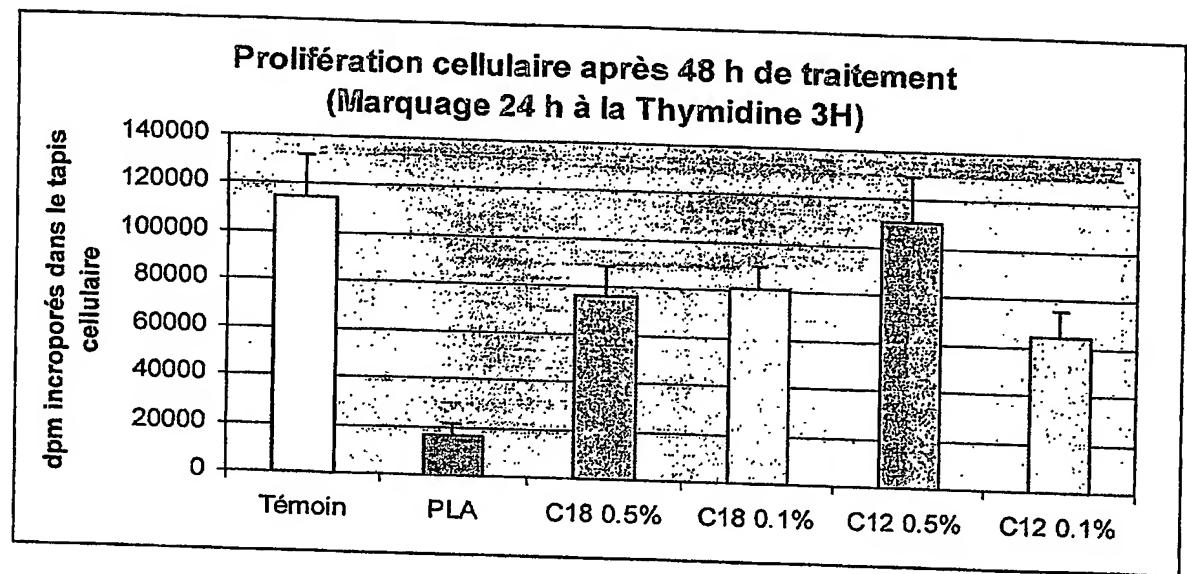
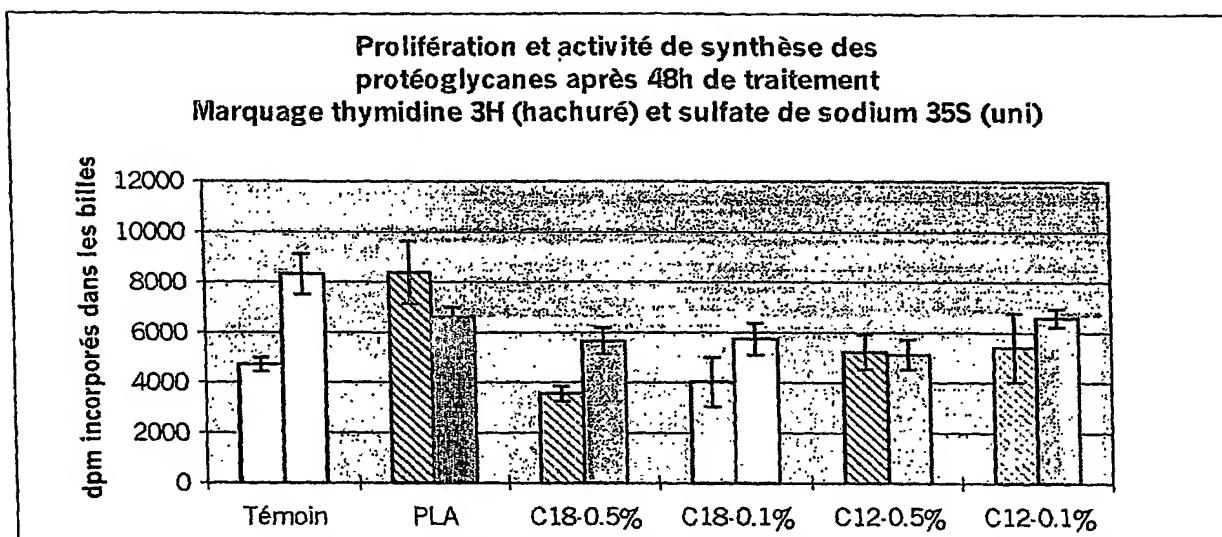
Figure 1

Figure 2



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /25

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BR35319/CR/PLC/ao
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02 09436

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Particules revêtues en surface de hyaluronane ou d'un de ses dérivés et leur utilisation à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3 rue Michel Ange.
75794 PARIS CEDEX 16

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		DELLACHERIE	
Prénoms		Edith	
Adresse	Rue	15 rue Jean Ploussard	
	Code postal et ville	54220	MALZEVILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LEONARD	
Prénoms		Michèle	
Adresse	Rue	471 rue de la Libération	
	Code postal et ville	54230	CHALIGNY
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GREF	
Prénoms		Ruxandra	
Adresse	Rue	14 rue Moulin Fidel	
	Code postal et ville	92350	LE PLESSIS ROBINSON
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
22 MAI 2003 Pascale LE COUPANEC 98-0402			



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i>	BR35319/CR/PLC/AO
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02 09436

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Particules revêtues en surface de hyaluronane ou d'un de ses dérivés et leur utilisation à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3 rue Michel Ange
75794 PARIS CEDEX 16

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		NETTER	
Prénoms		Patrick	
Adresse	Rue	26 rue de Cronstadt	
	Code postal et ville	54000	NANCY
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
Nom		PAYAN	
Prénoms		Elisabeth	
Adresse	Rue	5 route de Lagney	
	Code postal et ville	54570	TRONDRES
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance <i>(facultatif)</i>			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE <i>(Nom et qualité du signataire)</i>			
22 MAI 2003 Pascale LE COUPAMEC 98 0402			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.